

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 17 年度採択研究代表者

森 勇介

(大阪大学大学院工学研究科 助教授)

「タンパク質完全結晶創成」

1. 研究実施の概要

本研究では、我々がこれまでに開発した新しいタンパク質結晶化手法である①レーザーによる結晶核発生方法、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメーターの探索を行い、難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立を目指している。

原理の解明と技術の高度化のために、物理的パラメータとして、レーザーの波長やパルス幅、溶液の圧力を制御することを考え、その装置を構築した。また、これまでの技術の最適化により、タンパク質膜透過装置である SecDF 複合体膜タンパク、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum* (Pf)) 由来ピリミジン合成酵素、膜タンパク質 SHPS-1、RNA 修飾酵素複合体、ATP 合成酵素、human triosephosphate isomerase、アミロイド β ペプチドの高品質結晶育成に成功している。

さらに、全固体 193 nm レーザー光、及びフェムト秒レーザーにより初めて、膜タンパク質の加工や液中密閉環境での加工が実証できた。

今後は様々な膜タンパク質や難結晶化水溶性タンパク質を結晶化することで、本技術の優位性を実証しながら、結晶化における共通のパラメーターを探し出し、より汎用性の高いシステムの構築を行う。

2. 研究実施内容

本研究では、我々がこれまでに開発した新しいタンパク質結晶化手法である①レーザーによる結晶核発生方法、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメーターの探索を行い、難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立を目指している。

【新規装置導入について】

レーザー核発生技術に関して、本年度では、既に精製方法が確立しているタンパク質について、様々なレーザー照射条件を試して最適なレーザー照射条件を検索するために、波

長・パルス幅可変のフェムト秒レーザー装置を整備し、動作確認を実施した。その結果、波長 780 nm, 390 nm, 260 nm、パルス幅 200 fs~2 ps での可変発振を確認し、各条件でのレーザーを独立に顕微鏡に導入できる光学系も構築した。今後これらパラメーターに対しての結晶化確率を、タンパク質の種類や分子量などとの相関も踏まえつつ統計学的な観点から解析を行うことで、レーザー核発生技術の向上と原理解明を目指す。

さらに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメーターとして、溶液の圧力に注目し、タンパク質の溶解度を制御するために、高圧化での結晶育成が行える装置の開発を行った。簡易型加圧装置により 1000 気圧まで加圧可能な装置を構築した。まずはリゾチームについて、加圧条件での溶解度について実験を行った。その結果、リゾチームでは高圧ほど溶解度が低下することが確認できた。これは低圧下で溶解させてから高圧下に条件を持っていけば、結晶核発生が誘導できるということを意味している。平成 18 年度は膜タンパク質である大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB を用いて、高圧下での溶解度について調べる予定である。

【結晶育成について】

平成 17 年度では、これまで開発してきたレーザー核発生技術と溶液攪拌技術を用いて、様々なタンパク質の結晶化を実施している。それらの成果を以下に示す。

- (1) 蛋白質膜透過装置である SecDF 複合体膜蛋白質の結晶化（京都大学ウイルス研究所の伊藤惟昭教授との共同研究）
従来法では、5.6 Å 分解能しか得られなかったが、結晶の高品質化に成功し、3.78 Å 分解能までの X 線回折強度データが得られた。
- (2) 熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum* (Pf)) 由来ピリミジン合成酵素の結晶化（大阪大学微生物研究所の堀井俊宏教授との共同研究）
Pf 由来 Orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (pyr6) の結晶化に成功し、2.8 Å 分解能までの X 線回折データを収集した。
- (3) 膜タンパク質 SHPS-1 の結晶化（大阪大学蛋白質研究所の中川敦史教授との共同研究）
免疫系・神経系で重要な役割を果たすと考えられている膜蛋白質 SHPS-1 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase [SHP] substrate-1) の結晶化に成功し、2.8 Å 分解能までの X 線回折データを収集した。
- (4) RNA 修飾酵素複合体の結晶化（東京工業大学の濡木理教授との共同研究）
RNA 修飾酵素複合体である MnmA と tRNA^{Glu} の結晶の高品質化に成功し、3.1 Å 分解能までの X 線回折データを収集した。
- (5) ATP 合成酵素の結晶化（国立遺伝学研究所の白木原康雄助教授との共同研究）
分子量 50 万を越える蛋白質複合体である ATP 合成酵素結晶の高品質化に成功した。

(6) TIM の結晶化 (アステラス製薬との共同研究)

human triosephosphate isomerase (TIM)は地上での結晶化実験では、良好な結晶が得られず、宇宙空間での結晶化により 2.2 Å分解能までのX線回折データが得られていた。地上での攪拌実験により、より大型で良質な結晶が得られ、1.2 Å分解能までのX線回折データが収集できた。

(7) 当研究グループの高野が進めているアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドβペプチド(Aβ)の構造解析において、Aβの主要部分と超好熱菌由来タンパク質の融合タンパク質の結晶を攪拌技術により作製し、Aβの主要部分の構造を初めて決定することができた。

【結晶加工について】

これまで、大阪大学で開発した全固体 193 nm レーザー光によるアブレーションでの結晶加工では水溶性タンパク質について実施し、球状に加工することで対象性を向上させ、また損傷部位を除去することや、結晶周囲の溶液やルーペ部分といった構造解析の信号のノイズ源となる箇所を除去することで、X線回折の精度の向上に成功してきた。今年度は、この技術が膜タンパク質結晶にも適用できるか実験を行った。膜タンパク質 AcrB の結晶を用いて、193 nm の紫外レーザーによる加工を施し、X線回折強度データの収集に影響がであることを確認したところ、100 K の乾燥窒素の吹き付ける条件下でナイロンルーペ、結晶、その周囲の溶液由来のアモルファス固体をレーザーアブレーションによりカットすることが出来た。この切断によるX線回折パターンへの影響を調べたところ、レーザーでカットしない結晶と比べて遜色ないX線回折強度が得られ、レーザーによる悪影響はないことが明らかになった。

また、液中密閉環境での結晶加工の試みとして、フェムト秒レーザーを用いた加工実験にも着手した。タンパク質の結晶においては、乾燥などによる変性を防ぐため液中で加工する必要があるが、メスタイプのツールでは密閉環境での精密加工が不可能であり、紫外線レーザーによる加工においても液を除去または置換する必要があった。しかし、フェムト秒レーザーによる多光子吸収を利用することで、溶液の光吸収を防ぎ集光領域のみでアブレーションを誘起できるため、液中密閉環境での加工が実現できると考えられる。そこで、まずリゾチーム結晶を用いて実験を行ったところ、リゾチーム溶液内での結晶の切断加工に成功した。切断した結晶のX線回折パターンを測定したところ、1.9 Åと切断前の結晶と同程度の精度が得られ、レーザー照射による悪影響はないことが明らかになった。今後膜タンパク質など他のタンパク質結晶に対しても本技術が適用できるか検証していく予定である。

3. 研究実施体制

「工学研究科」グループ

- ① 研究分担グループ長：森 勇介（大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻、助教授）
- ② 研究項目：本研究では、フェムト秒レーザー照射による核発生技術や溶液攪拌による結晶高品質化技術などの新しいタンパク質結晶化手法の高度化、及び結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメーターの探索を行い、膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめ、様々な難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究を以下の（１）～（４）の項目に沿って行う。
 - （１）レーザー核発生技術の高度化
 - （２）溶液攪拌技術の高度化
 - （３）レーザープロセッシング技術の開発
 - （４）水溶性タンパク質完全結晶創成

「産研」グループ

- ① 研究分担グループ長：村上 聡（大阪大学産業科学研究所、助教授）
- ② 研究項目：タンパク質結晶化のなかでもとりわけ困難であるということが良く知られている膜タンパク質の結晶化は、構造生物学分野での最後の開拓地であると表現されている。我々がこれまで開発してきた高品質結晶化支援のための技術を、膜タンパク質に対して適用させる為に、より多くの膜タンパク質結晶化に対して結晶化を実施し、技術の一般化を目指す。大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBをサンプルとして、結晶化技術を改良すると共に、他の膜タンパク質標品の大量精製の為の遺伝子組み換え実験や、生化学実験を以下の項目に沿って行う。
 - （１）AcrB タンパク質の大量精製および、結晶化
 - （２）大腸菌薬剤排出トランスポーターのクローニング及び大量精製条件の検討

4. 主な研究成果の発表

（１）論文（原著論文）発表

- Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon -associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*
Acta Crystallogr. F62 (2006) 376-380
T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, T. Numata, A. Perederina, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, D. G. Vassylyev,

O. Nureki and K. Ito

- Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tRNA thiolation enzyme MnmA from *Escherichia coli* complexed with tRNA Glu
Acta Crystallogr. F62 (2006) 368-371
T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki and O. Nureki
- Crystallization and preliminary X-ray analysis of rat SHPS-1
Acta Crystallogr. F62 (2006) 189 - 191
A. Nagata, H. Ohnishi, M. Yoshimura, A. Ogawa, S. Ujita, H. Adachi, M. Okada, T. Matozaki, A. Nakagawa
- Solution-Stirring Method Improves Crystal Quality of Human Triosephosphate Isomerase
J. Biosci. Bioeng. 101 (2006) 83-86
H. Adachi, A. Niino, T. Kinoshita, M. Warizaya, R. Maruki, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, Y. Mori and T. Sasaki
- Effect of Laser Irradiation on Enzyme Activity
Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) 8216-8218
S. Murakami, M. Kashii, H. Kitano, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi, K. Sugamoto, H. Yoshikawa and T. Sasaki
- Processing of Membrane Protein Crystal Using UV Laser Irradiation
J. Biosci. Bioeng. 100 (2005) 50-53
H. Kitano, S. Murakami, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki
- Semiautomatic Protein Crystallization System Featuring Crystallization Solution Preparation Function
Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) 6302-6303
H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, A. Niino, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori and T. Sasaki
- Structural Basis of Compound Recognition by Adenosine Deaminase
Biochemistry 44 (2005) 10562-10569
T. Kinoshita, I. Nakanishi, T. Terasaka, M. Kuno, N. Seki, M. Warizaya, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, H. Adachi, Y. Mori, and T. Fujii
- Femtosecond Laser Processing of Protein Crystals in Crystallization Drop
Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) L873-L875
M. Kashii, H. Kitano, Y. Hosokawa, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki, H. Masuhara, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto and H. Yoshikawa

- Temperature-Screening System for Determining Protein Crystallization Conditions
Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) 4080–4083
H. Adachi, A. Niino, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. M. and T. Sasaki
- Solution stirring initiates nucleation and improves the quality of adenosine deaminase crystals
Acta Cryst. D61 (2005) 759–762
H. Adachi, K. Takano, A. Niino, H. Matsumura, T. Kinoshita, M. Warizaya, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki
- Protein Crystal Growth Using Laser-Processed Seed Crystals
Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) 3177–3179
K. Takeuchi, H. Kitano, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, M. Doi, Y. Koga, K. Takano and S. Kanaya